II. TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Sapi Bali

Sapi bali merupakan sapi potong asli Indonesia yang merupakan hasil domestik dari banteng (*Bibos banteng*) adalah jenis sapi yang unik. Sapi asli Indonesia ini sudah lama di domestikasi suku bangsa Bali di pulau Bali sekarang sudah tersebar di bebagai daerah di Indonesia. Sapi bali berukuran sedang, dadanya dalam, tidak berpunuk dan kakinya ramping. Kulitnya berwarna merah bata, cermin hidung, kuku dan bulu ujung ekornya berwarna hitam, kaki di bawah persendihan karpal dan tursal berwarna putih (Toelihere, 1993).

Ditemukan juga bagian putih di bagian pantat dan paha bagian dalam, kulit yang berwarna putih tersebut berbentuk oval. Pada punggungnya selalu di temukan bulu hitam membentuk garis (garis belut) memanjang dari gumba hingga pangkal ekor. Sapi bali jantan berwarna lebih gelap bila di bandingkan dengan sapi bali betina. Warna sapi bali jantan biasanya berubah dari merah bata menjadi coklat tua atau hitam legam setelah mencapai dewasa kelamin (Toelihere, 1993).

2.2. Organ Reproduksi Sapi Jantan

Organ reproduksi hewan jantan dapat dibagi atas tiga komponen : (a) organ kelamin primer, yaitu *gonad* jantan, dinamakan testis, (b) sekelompok kelenjar-kelenjar kelamin pelengkap yaitu kelenjar *vesikulares*, *prostate* dan *cowper* dan saluran-saluran yang terdiri dari *epididymis* dan *vas deferens*, dan (c) alat kelamin luar atau *kopulatoris* yaitu *penis*. Organ kelamin primer atau testes

berjumlah dua buah dan pada ternak mamalia secara normal terdapat di dalam suatu kantong luar scrotum (Toelihere, 1993).

Bentuk testes bulat panjang, dengan sumbu memanjangnya ke arah vertical. Pada hewan dewasa panjang testes 12 sampai 15 cm dan diameter berkisar dari 6 sampai 8 cm, berat sebuah testes termasuk *tunika albugenia* dan *epididymis* berkisar antara 300 sampai 500 gram, tergantung pada umur, jenis sapi dan kondisi makanan. Testes mempunyai dua fungsi penting untuk menghasilkan spermatozoa dan horman-hormon jantan androgen (Partodihardjo, 1992). Spermatozoa dihasilkan dalam testes yaitu di dalam *tubuli siminiferi* melalui proses spermatogenia yang terdiri dari dua fase utama yaitu :

(a) Fase perkembangan awal sel spermatogenia secara pembelahan mitosis dari jumlah sel menjadi dua kali (*fase spermatocytogenesis*). (b) Fase spermiogenesis yaitu spermatid mengalami *metamorphosis* dan berubah bentuknya dan menghasilkan spermatozoa sempurna (Salisbury dan Van Demark, 1985).

2.3. Penampungan Semen

Semen adalah zat cair yang keluar dari tubuh melalui penis sewaktu kopulasi (Partodihardjo, 1992). Di tambahkan Toelihere, (1993) semen adalah sekresi kelamin jantan yang secara normal diejakulasikan ke dalam saluran kelamin betina sewaktu kopulasi, tetapi dapat pula ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan inseminasi buatan.

Metode penampungan semen memakai vagina buatan sangat popular dan kini dipakai secara meluas pada pusat-pusat inseminasi buatan. Pada penampungan semen menggunakan vagina buatan libido justru diusahakan

dipertinggi untuk memperoleh semen berkuantitas dan berkualitas tinggi. Untuk itu sebelum penampungan biasanya dilakukan dengan tidak menampung semen pada penampungan pertama atau kedua, disebut *false mount* (Toelihere, 1993). Suatu *false mount* menyebabkan dua kali lipat konsentrasi spermatozoa diperoleh tanpa pengekangan.

2.4. Kualitas Semen

Untuk keberhasilan perkawinan atau IB, semen harus diproduksi dalam jumlah dan kualitas yang tinggi. Pemeriksaan dan evaluasi meliputi keadaan umum contoh semen, volume, konsentrasi dan motilitas atau daya geraknya. Observasi ini perlu untuk penentuan kualitas semen dan daya reproduksi pejantan (Toelihere, 1993). Salisbury dan Van Demark (1985) menyatakan bahwa kriteria mengenai penilaian semen bertujuan untuk mendapatkan suatu cara pendugaan tidak langsung mengenai potensi semen untuk memperlihatkan fungsi fertilisasinya.

Pemeriksaan dan evaluasi semen penting dilakukan untuk menentukan kualitas semen dan daya reproduksi pejantan, khususnya untuk menentukan kadar pengencer, karakteristik semen dapat digunakan sebagai indikator dari fertilitas (Toelihere, 1993). Berdasarkan gerakan individual, dilakukan penilaian sebagai berikut : 0. Spermatozoa immotil atau tidak bergerak, 1. Gerak berputar ditempat, 2. Gerak berayun atau melingkar, kurang dari 50 bergerak progresif atau tidak ada gelombang, 3. Antara 50 sampai 80% spermatozoa bergerak progresif dan menghasilkan gerakan massa, 4. Pergerakan progresif gesit dan segera

membentuk gelombang dengan 90% sel spermatozoa motil, 5. Gerakan sangat progresif, gelombang sangat cepat bergerak, 100% motil aktif (Toelihere, 1993).

Sedangkan penilaian gerakan massa, kualitas semen dapat ditentukan sebagai berikut : (a) Sangat baik (+ + +), terlihat gelombang-gelombang besar, banyak, gelap, tebal dan aktif bagaikan gumpalan awan hitam dekat waktu hujan yang bergerak cepat berpindah-pindah tempat. (b) baik (+ +), bila terlihat gelombang-gelombang kecil, tipis, jarang, kualitas jelas dan bergerak lamban. (c) cukup (+), jika tidak terlihat gelombang melainkan hanya gerakan-gerakan indivual aktif progresif. (d) buruk (N, necrospermia atau O), bisa hanya sedikit atau tidak ada gerakan-gerakan individual (Toelihere, 1993).

2.5. Motilitas Sperma

Ciri utama spermatozoa adalah motilitas atau daya geraknya yang dijadikan patokan atau cara yang paling sederhana dalam penilaian semen untuk inseminasi buatan (Toelihere, 1993). Salisbury dan Van Demark (1985) menyatakan bahwa ada tiga motilitas spermatozoa : (a) Gerakan progresif. (b) Gerakan berputar. (c) Gerakan ditempat. Dua tipe gerakan terakhir disebabkan oleh gerak ayun-ayun ekor yang abnormal dan ditambahkan bahwa motilitas kurang dari 50 % akan menghasilkan angka konsepsi yang lebih rendah.

Toelihere (1993) menyatakan bahwa motilitas spermatozoa sapi di bawah 40% menunjukkan nilai semen yang kurang baik dan sering di hubungkan dengan infertilitas. Kebanyakan pejantan fertile mempunyai 50-80% spermatozoa motil, aktif progresif. Penilaian spermatozoa yang aktif yang bergerak atau hidup dilakukan pada suhu 37^0 C sampai 40^0 C, untuk persentase sperma yang aktif

tidak harus lebih besar dari pada 70%. Sama dengan yang di ungkapkan oleh Toelihere (1993) bahwa untuk memperoleh hasil yang lebih tepat sebaiknya semen diperiksa pada suhu 37^0 C sampai 40^0 C dengan menempatkan gelas objek di atas suatu meja panas atau menggunakan mikroskop yang di panaskan secara elektrik.

2.6. Abnormalitas Spermatozoa

Abnormalitas spermatozoa dapat dilihat pada kepala, badan dan ekornya, jumlah spermatozoa abnormal dihitung dari pemeriksaan sekitar seratus sampai dua ratus spermatozoa. Toelihere (1979), kelainan morfologi dibawah 20% masih di anggap normal. Salisbury dan Van Demark (1985) menyatakan bahwa kesuburan sapi jantan tergantung pada proporsi spermatozoa yang abnormal terhadap spermatozoa normal di dalam semen. Sedangkan abnormalitas spermatozoa 20% atau lebih kualitasnya dianggap jelek (Partodihardjo, 1992), spermatozoa yang abnormal kemungkinan tidak subur.

Bearden dan Fuguay (1980) mengklasifikasikan abnormalitas spermatozoa dalam abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Selanjutnya juga dinyatakan bahwa bentuk-bentuk abnormalitas primer spermatozoa tedapat didalam testes karena kesalahan spermiogenesis, faktor keturunan, penyakit,defisiensi makanan dan pengaruh lingkungan yang jelek. Bentuk abnormalitas primer terjadi selama perkembangan spermatozoa dalam *tubuli siminiferi* dan akibat cara penanganan seperti pemanasan yang berlebihan, pendinginan terlalu cepat, kontaminasi dengan air dan sebagainya.

Toelihere (1993) menyatakan bahwa abnormalitas primer meliputi kepala kecil, kepala besar, kepala miring, kepala kembar, ekor bercabang, leher besar dan melipat. Sedangkan abnormalitas sekunder meliputi ekor terputus, kepala tanpa ekor, bahagian tengah melipat, adanya butiran-butiran proto plasma proksimal atau distal dan akrosomal terlepas.

2.7. Membran Plasma Utuh

Dilakukan dengan menggunakan *Hypoosmotic Swelling Test*. Prosedur yang digunakan mengikuti petunjuk Jayendran *et al*. (1984) yaitu menggunakan medium Hos Test berupa NaCl hipotonik (0.031 m; terbuat dari 0.179 g NaCl yang dilarutkan dengan 100 ml akuabides). Sebanyak 0,1 ml semen ditambah dengan 9.9 ml medium HOS Tes, selanjutnya diinkubasi selama satu jam pada suhu 37℃ dalam water bath. Semen yang telah diinkubasi dievaluasi dengan menggunakan mikroskop cahaya 40 kali. Jumlah spermatozoa yang di hitung adalah 200 dengan skala 0 sampai 100 persen. Semen akan memperlihatkan perubahan morfologi bila diinkubasi pada medium hipotonik.

Spermatozoa diencerkan dengan menggunakan medium pengencer dasar komersil Andromed (Minitub, 2001). Andromed terdiri atas tris hidroksi metal aminometan, fruktosa, asam sitrat dan beberapa jenis antibiotik (Minitub, 2001). Sebagai kontrol, di gunakan andromed yang di encerkan dengan akuabidest dengan perbandingan 1:4, pengamatan dilakukan setelah 2, 4 dan 6 jam penyimpanan pada suhu 5 ^{0}C.

2.8. Morfologi Spermatozoa

Spermatozoa merupakan suatu sel kecil, kompak dan sangat khas yang tidak tumbuh membagi diri. Secara esensial spermatozoa terdiri dari kepala yang membawa herediter paternal dan ekor untuk bergerak. Spermatozoa secara sitologik dibagi atas kepala dan ekor. Ekor terbagi menjadi beberapa bagian yaitu bagian tengah atau leher, bagian utama dan bagian ujung (Partodihardjo, 1992). Spermatozoa tidak memegang peranan apa pun dalam bidang fisiologis hewan yang menghasilkan nya tetapi hanya untuk melibatkan diri dalam pembuahan untuk membentuk individu baru sejenis dari mana spermatozoa itu berasal (Toelihere, 1979).

Unsur kimia yang terpenting dari spermatozoa adalah *deoxyribonukleo* protein yang terdapat dalam inti ikatan protein *mucopolysaccarida* di dalam akrosom, plasmalogen di bagian tengah dan ekor. Protein yang berupa kreatin menyusun membran dan fibril-fibril serta enzim dan koenzim yang mengontrol motilitas dan aktivitas metabolisme spermatozoa. Spermatozoa sebagian besar terdiri dari :(a*) Deoxyribonucleo*protein yang terdapat dalam nukleus yang merupakan kepala dari spermatozoa. (b) *Mucopolysaccarida* yang terikat pada molekul-molekul protein terdapat akrosom, yaitu bagian pembungkus kepala. (c) Plasmalogen atau lemak *aldehydrogen* yang terdapat pada bagian leher, badan dan ekor dari spermatozoa, merupakan bahan yang digunakan oleh spermatozoa untuk respirasi endogen. (d) Protein yang merupakan keratin yang merupakan selubung tipis yang meliputi seluruh badan, kepala dan ekor dari spermatozoa. Protein ini banyak menggunakan ikatan dengan unsur zat tanduk yaitu S (Sulfur). Protein ini banyak terdapat pada membran pada sel-sel dan fibril-fibrilnya. (e) Enzim dan

koenzim yang pada umumnya digunakan untuk proses hidrolisis dan oksidasi (Partodihardjo, 1992).

Salisbury dan Van Demark (1985) menyatakan bahwa spermatozoa normal terdiri dari kepala, leher dan ekor. Di bawah mikroskop bagian dinding depan kepala tampak sekitar dua pertiga bagian tertutup oleh akrosom. Tempat sambungan dasar akrosom dan kepala disebut cincin nukleus, di antara kepala dan badan terdapat sambungan pendek yaitu leher yang berisi sentriol proksimal, kadang dinyatakan sebagai pusat kinetik aktivitas spermatozoa. Bagian badan mulai dari leher dan berlanjut ke cincin sentriol. Bagian badan dan ekor mampu bergerak bebas, meskipun tanpa kepala. Ekor merupakan cambuk, membantu mendorong spermatozoa bergerak maju.

Salisbury dan Van Demark (1985) menyatakan bahawa sesuai dengan bentuk morfologi spermatozoa atau pola metaboliknya yang khusus dengan dasar produksi energi, spermatozoa hidup dapat mendorong dirinya sendiri maju kedepan di dalam lingkungan zat cair. Pada umumnya setiap penyimpangan morfologi dari struktur spermatozoa yang normal dipandang sebagai abnormal.

2.9. Motilitas Spermatozoa Sebelum dan Setelah Pengenceran

Spermatozoa adalah sel yang halus yang mudah sekali mati, untuk itu semen harus dihindarkan dari panas yang berlebihan, penyimpanan yang terlalu lama pada suhu ruang, air atau bahan kimia, hubungan yang terlalu lama dengan udara luar terutama sinar matahari langsung (Partodihardjo, 1992). Toelihere (1993) menyatakan bahwa segera sesudah penampungan, semen harus diperlakukan hati-hati untuk mencegah *cold shock* atau pemanasan tinggi,

kontaminasi dengan air, *urine* dan bahan-bahan kimia, pengocokan atau goncangan yang berlebih-lebihan atau *exposure* ke udara atau sinar matahari yang langsung. Toelihere (1979) menyatakan bahwa semen yang baru ditampung sebaiknya segera ditempatkan dalam tabung berisi air hangat pada suhu tubuh (37^oC).

Toelihere (1993), menambahkan spermatozoa dalam semen cair dapat tahan hidup 7 sampai 14 hari, tetapi sebaiknya dipakai semen yang disimpan kurang dari 14 hari. Semen cair sebelum di inseminasikan perlu diencerkan untuk memperbesar volumenya, dan dapat mempertahankan kehidupan spermatozoa baik motilitas maupun fertilitasnya. Untuk itu bahan pengencer harus bersifat melindungi spermatozoa terhadap kemungkinan pengaruh yang bisa merusak akibat perlakuan pada saat pengenceran, bahan pengencer yang digunakan sebaiknya mengandung bahan-bahan yang dibutuhkan semen.

Semen sapi apabila diberi sitrat kuning telur sekitar 20% memberikan daya hidup spermatozoa sapi FH selama 14,71 hari. Salisbury dan Van Demark (1985) menyatakan bahwa selama semen disimpan, spermatozoa menggunakan fruktosa yang ada dalam pengencer untuk metabolisme glukosa serta karbohidrat lainnya bisa berubah menjadi fruktosa kemudian digunakan untuk metabolisme. Hasil akhir metabolisme fruktosa ini adalah asam laktat yang dapat menurunkan pH pengencer.

2.10. Ekuilibrasi dan Pembekuan Semen

Ekuilibrasi secara tradisional dianggap sebagai waktu total selama spermatozoa tetap berhubungan dengan gliserol sebelum pembekuan. Pada tahap

ini, gliserol menembus ke dalam sel spermatozoa untuk membentuk konsentrasi intraseluler dan ekstraseluler yang seimbang. Tidak boleh diabaikan bahwa pada ekuilibrasi tidak hanya terjadi keseimbangan konsentrasi gliserol, tetapi juga komponen ekstender osmotis aktif lainnya (Salamon dan Maxwell, 2000).

Waktu ekuilibrasi berbeda-beda pada berbagai jenis, bangsa dan individu pejantan. Menurut Toelihere (1979), bahwa semen harus berada di dalam pengencer dengan atau tanpa gliserol selama kurang lebih 4 jam pada suhu 5^0C. Menurut Arifiantini dan Yusuf (2006), ekuilibrasi bertujuan melindungi spermatozoa dari kematian yang disebabkan oleh penurunan tekanan osmotik yang mengganggu keutuhan membran spermatozoa akibat pembekuan.

Toelihere (1979) menyatakan bahwa problema pembekuan semen berkisar pada fenomena pengaruh *cold shock* terhadap sel yang dibekukan dan perubahan perubahan intraseluler akibat pengeluaran air yang bertalian dengan pembentukan-pembentukan kristal es, pembekuan adalah suatu fenomena pengeringan fisik. Pada pembekuan semen, dimana terbentuk kristal-kristal es, terjadi penumpukan elektrolit dan bahan terlarut lainnya di dalam larutan atau di dalam sel-sel. Spermatozoa sapi banyak mengalami kerusakan pada suhu-suhu kritik antara -1.5^0 C dan -30^0 C, rata-rata pada suhu -17^0 C.

Untuk mempertahankan kehidupan spermatozoa maka semen beku harus selalu disimpan dalam bejana vakum atau kontainer berisi nitrogen cair yang bersuhu -196^{0}C dan terus dipertahankan pada suhu tersebut sampai waktu dipakai. Sesudah pencairan kembali (*thawing*) semen beku merupakan barang rapuh dan tidak dapat tahan lama seperti semen cair. Semen beku yang sudah dicairkan kembali tidak dapat dibekukan kembali (Toelihere, 1979).

2.11. Jenis-jenis Pengencer

2.11.1. Andromed

Andromed merupakan salah satu pengencer komersial berbahan dasar Tris yang tidak menggunakan sumber protein asal hewan yang menjadi andalan untuk pengencer semen beku sapi (Minitub, 2001). Dengan adanya medium komersial ini diharapkan dapat mempermudah penyiapan medium untuk pengenceran dan penyimpanan semen dalam jangka waktu panjang.

Kandungan Andromed terdiri dari *phospholipid*, tris (*hydroxymethyl*) aminomethane, asam sitrat, fruktosa, gliserol, lesitin, *tylosine tart rat*, *gentamycin sulfat*, *spectinomycin* dan *lincomicin* yang biasa digunakan untuk pembuatan semen beku sapi (Minitub, 2001). Tatacara penggunaan dilakukan hanya dengan penambahan aquades steril (milli-Q-water) dengan perbandingan Andromed : aquades steril = 1 : 4.

Sumber lesitin di dalam pengencer semen komersial Andromed berasal dari ekstrak kacang kedelai, yang juga dapat menjalankan fungsi seperti pada lesitin kuning telur. Semua bahan yang terkandung di dalam Andromed tersebut merupakan bahan-bahan yang umum digunakan dalam menyusun pengencer semen selama ini. Lesitin berfungsi melindungi membran plasma sel dari pengaruh *cold shock* selama proses pengolahan berlangsung (Aku, 2005).

2.11.2. Tris Kuning Telur

Bahan pengencer Tris Kuning Telur terdiri dari Tris *aminomethane*, asam sitrat *monohidrat*, kristal *glukosa*, kuning telur, penicillin, strepromycin dan *aquabidest*. Tris *aminomethane* berfungsi sebagai buffer dan mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit. Kuning telur berfungsi melindungi

spermatozoa terhadap *cold shock* dan sebagai sumber energi (Triana, 2005). Sekitar 30% dari berat telur adalah bagian dari kuning telur. Kuning telur memiliki komposisi gizi yang lebih lengkap dibanding putih telur. Komposisi kuning telur terdiri dari air, protein, lemak, karbohidrat, mineral dan vitamin (Sarwono, 1995). Protein telur termasuk sempurna karena mengandung semua jenis asam amino esensial dalam jumlah yang cukup seimbang (Haryanto, 1996). Menurut Toelihere (1985) kuning telur mengandung lipoprotein dan lechitin yang mempertahankan dan melindungi integritas dan selubung lipoprotein dari sel spermatozoa dan mencegah *cold shock*.

2.11.3. Tris Susu Skim

Menurut Buckle (1987), susu skim adalah bagian susu yang tertinggal setelah lemak/krim di ambil sebagian atau seluruhnya. Susu skim mengandung semua zat makanan dari susu kecuali lemak dan vitamin-vitamin yang larut dalam lemak (kandungan lemak <1%). Nilai kalori susu skim cukup rendah hanya mengandung 55% dari seluruh energi susu.

Susu skim juga mengandung zat nutrisi yang dapat dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai sumber energi. Selain itu, susu skim juga mengandung zat lipoprotein dan lesitin sehingga bisa digunakan dalam pengencer semen untuk melindungi spermatozoa dari pengaruh kejut dingin (*cold shock*) dan air susu juga mengandung enzim yang hancur pada waktu pemanasan dimana pemanasan air susu dia atas 80ºC akan melepaskan gugusan sulfhydril (-SH) yang berfungsi sebagai zat reduktif yang mengatur metabolisme oksidatif sperma (Solihati, 2008).